

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-349892

(43)Date of publication of application : 04.12.1992

(51)Int.Cl.

G12P 19/34
G07H 1/08
G07H 21/04
G12N 15/10

(21)Application number : 03-115885

(71)Applicant : TOSHIBA CORP

(22)Date of filing : 21.05.1991

(72)Inventor : MIWA KEIKO
ISHIMORI YOSHIO

(54) METHOD FOR ISOLATING NUCLEIC ACID

(57)Abstract:

PURPOSE: To improve efficiency of operation such as genetic analysis requiring steps for isolating nucleic acid due to its isolation from a biological sample practicable in a shorter time than that in conventional methods by applying impact force to cells in chemically destroying the cells.

CONSTITUTION: Cells are initially and chemically destroyed while applying impact force to the cells. Proteins of the destroyed cells are then denatured and insolubilized by preferably adding an acid and/or heat. The insolubilized proteins are subsequently removed. The cells are destroyed by placing small pieces for destruction such as beads made of glass in a cell solution to which a surfactant, e.g. saponin is added and vigorously stirring the cells.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-349892

(43) 公開日 平成4年(1992)12月4日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 19/34		8214-4B		
C 0 7 H 1/08		7822-4C		
21/04	A	7822-4C		
C 1 2 N 15/10		8828-4B	C 1 2 N 15/00	A

審査請求 未請求 請求項の数2 (全 4 頁)

(21) 出願番号 特願平3-115885

(22) 出願日 平成3年(1991)5月21日

(71) 出願人 000003078

株式会社東芝

神奈川県川崎市幸区堀川町72番地

(72) 発明者 三輪 桂子

神奈川県川崎市幸区小向東芝町1番地 株式会社東芝総合研究所内

(72) 発明者 石森 義雄

神奈川県川崎市幸区小向東芝町1番地 株式会社東芝総合研究所内

(74) 代理人 弁理士 則近 憲佑

(54) 【発明の名称】 核酸の単離方法

(57) 【要約】

【目的】 生体試料から、短時間で、しかも安全に核酸を単離する方法を提供することを目的とする。

【構成】 生体試料中に含まれる細胞を破壊する工程と、破壊された細胞の蛋白質を変性させ不溶化する工程と、不溶化した蛋白質を除去する工程を備えた核酸の単離方法において、細胞に衝撃力を加えて破壊することを特徴とする核酸の単離方法である。また、酸または熱の少なくとも一方を加えることにより破壊された細胞の蛋白質を変性させ不溶化することにより核酸を単離する方法である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】化学的に細胞を破壊する工程と、破壊された細胞の蛋白質を変性させ不溶化する工程と、不溶化した蛋白質を除去する工程とを備えた核酸の単離方法において、細胞を化学的方法を用いて破壊する際に細胞に衝撃力を加えることを特徴とする核酸の単離方法。

【請求項2】細胞を破壊する工程と、破壊された細胞の蛋白質を変性させ不溶化する工程と、不溶化した蛋白質を除去する工程を備えた核酸の単離方法において、酸または熱の少なくとも一方を加えることにより破壊された細胞の蛋白質を変性させ不溶化することを特徴とする核酸の単離方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の目的】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、核酸を含有する生体試料から核酸を単離する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】核酸の中でも、DNA（遺伝子）に刻み込まれた遺伝情報は、メッセンジャーRNAを介して蛋白質あるいは酵素として表現される。この蛋白質や、酵素の働きにより様々な化合物が生成され、それらの集合体として生物が存在しているのである。ヒトの遺伝子の総数は、5万～10万といわれているが、近年の分子生物学の発展により、その解析が分子レベルで急速に進んでいる。現在、世界的に行われているヒト・ゲノム・プロジェクトはその代表例である。ヒト・ゲノム・プロジェクトとはヒト遺伝子の配列をすべて決定しようとする試みである。また、遺伝子の異常に伴うような疾患を、直接それらの遺伝子を解析することで診断する、遺伝子診断と呼ばれる技術が、近年になって注目を集めている。ヒトの遺伝子の解析を行う際には、まず、組織細胞あるいは末梢血から、DNAを含む核酸を抽出し、精製する必要がある。

【0003】以下に従来、一般的に行われている生体の全血試料からのDNAの単離方法を示す。まず、凝結防止のためヘパリン処理した全血から、白血球を採取し、蛋白質分解酵素の存在下で界面活性剤を用いて試料中の細胞を破壊させる。界面活性剤は、細胞壁のみならず細胞内の核膜を破壊し、また、蛋白質分解酵素は、細胞内の余分な蛋白質を分解する。次に、フェノールおよびクロロホルムを加えることにより、残存物質である蛋白質を変性させ不溶化させる。不溶物およびフェノール層あるいはクロロホルム層を除去した水層にエタノールを加えて、核酸を沈殿させる。得られ核酸はほとんどがDNAよりなるが、さらに精製を必要とする場合には、核酸中にDNAと共に含まれるRNAを分解して除去するために、RNase処理をし、再びエタノールを加えてDNAを沈殿させる。従来は以上のようにして、精製されたDNAを得ていた。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】以上のような工程でDNAを得る際、核酸を単離するまでの工程では、細胞を破壊させるために蛋白質分解酵素の存在下で界面活性剤を用いるが、細胞膜や核膜を核酸の単離可能な状態にまで破壊するためには、界面活性剤を加えてから少なくとも4～5時間の時間を必要としていた。そのため、多数のサンプルの解析を必要とする遺伝子解析の作業においては効率が悪く、短時間で、核酸の単離を行う方法が求められていた。また、残存物質である細胞内の蛋白質を変性させるために、従来はフェノール、クロロホルムなどの実験者の健康に有害な有機溶媒を使用していた。

【0005】以上のような問題に鑑み、第1の発明の目的は、全血などの生体試料からの核酸の単離を短時間で行うことのできる核酸の単離方法を提供することである。また、第2の発明の目的は、有機溶媒を使用せずに、安全に作業を行うことのできる核酸の単離方法を提供するものである。

【発明の構成】

【0006】

【課題を解決するための手段および作用】本発明の第1の発明は、化学的に細胞を破壊する工程と、破壊された細胞の蛋白質を変性させ不溶化する工程と、不溶化した蛋白質を除去する工程を備えた核酸の単離方法において、細胞を化学的に破壊する際に細胞に衝撃力を加えることを特徴とする核酸の単離方法である。また、本発明の第2の発明は、細胞を破壊する工程と、破壊された細胞の蛋白質を変性させ不溶化する工程と、不溶化した蛋白質を除去する工程を備えた核酸の単離方法において、酸または熱の少なくとも一方を加えることにより破壊された細胞の蛋白質を変性させ不溶化することを特徴とする核酸の単離方法である。

【0007】生体試料から、核酸を単離するためには、まず最初に、生体試料に由来する細胞の細胞膜や核膜を破壊する工程が必要である。前記の工程で破壊された細胞を含む試料の中には核酸以外の残存物質が含まれている。試料中の残存物質の多くは生体内で機能分子として働いている蛋白質である。次に、核酸の単離のためには、まずそれらの蛋白質の変性工程を行い、その後、変性された蛋白質の除去工程を行うことが必要である。

【0008】本発明の第1の発明は、細胞を破壊する工程に関する発明で、細胞を破壊するために、化学的方法に加え、細胞に衝撃力を加えるものである。それにより、細胞の破壊工程を従来よりも短時間で行うことができる。

【0009】化学的に細胞を破壊する方法としては、界面活性剤を使用する。界面活性剤としては、例えば、サポニン、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、TritonX-100などを用いる。

【0010】細胞に衝撃力を与える方法としては、例え

3

ば、適当な大きさの破壊用小片を生体試料溶液に加え、激しく攪拌する方法がある。破壊用小片の材質はセラミックス、ガラス、樹脂等、核酸の単離に悪影響を及ぼさない限り、特に制限はない。破壊用小片の形状も特に制限はない。破壊用小片の大きさとしては、例えば形状が球形の場合、直径0.01mmから1mm程度のものが好ましい。破壊用小片が小さすぎると、破壊用小片が細胞に衝突しても細胞が破壊されにくく、大きすぎると、攪拌効率が悪くなるためである。また、この他の方法としては、超音波を加える方法などがある。

【0011】以上のようにして、細胞の破壊工程を行った後、蛋白質を変性し不溶化する工程を行う。蛋白質を変性し不溶化する工程は従来のようにフェノールやクロロホルムなどの有機溶媒を加えることにより行っても良いし、以下に示す本発明の第2の発明によって行っても良い。

【0012】第2の発明は、前工程で細胞膜や核膜を破壊された細胞を含む試料溶液に、酸または熱の少なくとも一方を加え、不純物である蛋白質を変性させ不溶化するものである。熱または、酸により細胞の蛋白質を変性

するため、有害な有機溶媒を用いる必要がない。

【0013】上記の酸としては、塩酸、酢酸、硝酸、硫酸など核酸の単離に悪影響を及ぼさない限り、特に制限はない。酸の濃度としては、0.1N以上、1N以下程度が好ましい。以上のような酸を試料溶液に加え作用させることにより、試料中に可溶であった蛋白質が不溶化し、コロイド状態となる。また、試料溶液に加える熱としては、試料溶液が沸騰する程度に加熱すれば良い。5分以上加熱し、沸騰を継続することにより試料中に可溶であった蛋白質が変性して不溶化し、コロイド状態となる。酸、および熱はどちらか一方を試料溶液に作用させれば良い。また、酸、および熱を共に作用させても良い。

【0014】また、細胞中の蛋白質を分解し、蛋白質の変性を促進するために、細胞を破壊する工程時に蛋白質分解酵素（プロテアーゼ）を加えて作用させてもよい。蛋白質分解酵素のなかでも、特に多種の蛋白質を分解可能なプロテイナーゼKが好ましい。

【0015】最後に、不溶化した蛋白質の除去工程を行う。不溶化した蛋白質の除去は、遠心分離・吸引による分離、あるいは、フィルタによる濾過分離などをおこない、試料溶液中の上清を得る。得られた上清中には、核酸が含まれているので、それをエタノール等の溶媒を用いて抽出し、核酸を得ることができる。

【0016】以上のようにして、得られた核酸にさらに精製を必要とする場合には、DNAを選択的に吸着するシリカなどのガラスビーズを用いる方法や、RNase処理を行う方法などがある。DNAを選択的に吸着するガラスビーズを用いる方法は、操作が容易かつ高純度のDNAが得られるため、好ましい。手順としては、DN

4

Aを選択的に吸着するガラスビーズおよび、吸着を促進する電解質を高濃度に加え、DNAをガラスビーズに吸着させた後、バッファーで洗浄し若干の加熱下で水またはTEバッファー（Tris-HCl, EDTA）中に溶出させる。以下に実施例により本発明を詳しく説明する。

【0017】

【実施例】

（実施例1）

【0018】ヘパリン採血した全血200 μ lに、0.1mm ϕ のガラス製のビーズを加え、5%サニボン500 μ l、細胞溶解液（1% TritonX-100と0.5%SDS 50mM EDTA）で2mlチューブを満たし、3分間激しくボルテックスにかけ、細胞を破壊した。次に、90℃で15分間インキュベートし、蛋白質を変性し不溶化させた。不溶化した蛋白質を除くため、フィルタ（Pore Size 0.45 μ m）を用いてろ過した。ろ液に3M酢酸ナトリウムおよび、2.5倍量のエタノールを加え、糸状のDNAをガラス棒で巻き取った。得られたDNAを70%エタノールで洗浄し、TE（10mM Tris-HCl, 1mM EDTA（pH8.0））200 μ lに溶解してDNA試料液を得た。200 μ lの全血から約3~4 μ gのDNAが得られ、制限酵素で切断可能であった。所要時間は約1時間であった。

（実施例2）

【0019】ヘパリン採血した全血200 μ lに、実施例1と同様にして細胞を破壊した試料液を得た。ついで、0.5NのHClを500 μ l加え、37℃で15分間インキュベートし、蛋白質を変性させ、不溶化した。その後、沈殿をフィルターろ過した。ろ液をNaOHで中和し、エタノールを加えてDNAを沈殿後、遠心によってDNAを得た。得られたDNAを70%エタノールで洗浄し、TE（10mM Tris-HCl, 1mM EDTA（pH8.0））200 μ lに溶解してDNA試料液を得た。200 μ lの全血から約3~4 μ gのDNAが得られ、制限酵素で切断可能であった。所要時間は約1時間であった。

（実施例3）

【0020】ヘパリン採血した全血200 μ lに、実施例1と同様にして、蛋白質を変性後フィルターろ過した、DNAを含むろ液に3倍量のヨウ化ナトリウムおよびDNA吸着ビーズを加え、室温で10分間放置した。さらに洗浄用バッファー（40mM Tris-HCl, 4mM EDTA（pH7.5））を用いてDNA吸着ビーズを洗浄し、TE（10mM Tris-HCl, 1mM EDTA（pH8.0））を加え、50℃に5分間放置して、DNAを溶出させた。200 μ lの全血から約2 μ gの純粋なDNAを得た。制限酵素で切断可能であり、所要時間は約1.5時間であった。

（比較例1）

【0021】ヘパリン採血した全血200 μ lに2~3倍量の氷冷した0.2%NaClを加えて赤血球を破壊し、4℃5000rpmで5分間遠心し、沈澱を得た。この操作を4回繰り返すことにより赤血球を完全に除いた。得られた沈澱

5

に1mlの10mMリン酸緩衝液(pH7.5)を加え、同様に遠心して、白血球の洗浄を行った。氷冷した細胞溶解液(0.32M Sucrose, 1% TritonX-100, 5mM MgCl₂, 10mM Tris-HCl(pH7.5))を0.5ml 加え、懸濁した後に、氷中に5~10分放置した。次に4℃ 5000rpm で15分間遠心し、得られた沈殿に氷冷した25mM EDTA (pH8.0) (75mM NaCl 含有) 0.5ml, 10% SDS 50 μ l、およびプロテイナーゼK (20mg/ml) 20 μ l を加えた後、37℃で2時間放置した。細胞を破壊する工程に、合計2時間45分かかった。等量のTE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA (pH 8.0)) 飽和フェノールを加え、ゆっくり10分間混和した後3000rpm で10分間遠心し水層を取りフェノール・クロロホルム溶液(1:1混合)、クロロホルムで同様に抽出した。2.5倍量のエタノールを加え糸状のDNAをガラス棒で巻き取り、70%エタノールで洗い、乾

6

燥した。得られたDNAは制限酵素で切断可能であり、全工程を行う所要時間は約3時間45分であった。

【0022】実施例1~3と比較例1とを比較してわかるように、細胞を破壊する工程にかかる時間が、実施例1~3が3分程度、比較例では2時間45分程度かかる事から、本発明によれば、核酸の単離が短時間で終わることが分かる。また、本発明によれば有機溶媒を用いずに核酸の単離を行うことができることがわかる。

【0023】

10 【発明の効果】以上の述べたように、第1の発明の方法によれば、短時間で核酸の単離を行うことができ、生体試料から核酸の単離を必要とする遺伝子解析などの作業の効率を向上させることができる。また、第2の発明の方法によれば、人体に有害な有機溶媒を用いることなく安全に作業を行うことができ、有益である。